

Determinación de microhongos filosféricos aislados de caucho natural (*Hevea brasiliensis*) en La Montañita, Caquetá

Armando Sterling Cuellar* & Lyda Constanza Galindo Rodríguez**

*Biólogo Msc. Catedrático Universidad de la Amazonia. Facultad de Ciencias Básicas.

**Bióloga grupo de investigación GINMUA. Universidad de la Amazonia. Facultad de Ciencias Básicas. Programa de Biología.

Recibido, 12 de Febrero de 2006; aceptado 23 de Abril de 2006

Resumen

En los viveros de Itarca-ASOHECA, municipio de la Montañita-Caquetá (Colombia), se sembraron individualmente 30 semillas de caucho natural (*Hevea brasiliensis*) en bolsa para "stump", con el fin de obtener plántulas de 30-45 días de edad, libres de agentes químicos tanto foliares como edáficos con el objeto de realizar el aislamiento de microhongos desde la filósfera a partir de folíolos en desarrollo fenológico C1. Los microhongos filosféricos se aislaron en los medios de cultivo PDA y AEM, y se incubaron a temperatura ambiente (26 °C) durante 5-28 días. Para el fijado en placa y la determinación taxonómica de los aislamientos, se utilizó la técnica del microcultivo, y se confrontaron en cada caso las características macro-microscópicas y culturales con los esquemas propuestos en distintas monografías. Se determinaron y caracterizaron 23 especies/categorías de microhongos filosféricos representados en 8 géneros, 1 morfotipo monilial y 2 morfotipos Zygomycetes, entre los que se destacaron los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* como los de mayor abundancia, mientras que los géneros *Pestalotia* y *Cunninghamella* fueron los menos abundantes. De los ocho géneros aislados, la literatura reporta a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces* como agentes antagonistas de diversos fitopatógenos en distintas especies vegetales cultivables. En conclusión, la filósfera de *H. brasiliensis* posee una rica micobiota saprofítica, la cual debe ser estudiada con mayor detenimiento no sólo para comprender las relaciones ecológicas inherentes sino además para aprovechar su potencial biocontrolador como estrategia de fitoprotección contra fitopatógenos del caucho natural.

Palabras clave: Filósfera, *Hevea brasiliensis*, microhongos.

Abstract

30 seeds of rubber (*Hevea brasiliensis*) were sown individually inside bags for "stump", in Itarca-ASOHECA'S nurseries La Montañita-Caquetá (Colombia) municipality. That was made in order to obtain seedlings of 30-45 days of age, free of foliar and soil chemical agents, of carry out the isolation of microfungi from phyllosphere of leaflets in state C1. Phyllosphere's microfungi were isolated in AEM and PDA culture mediums, and were incubated for 5-28 days at ambient temperature (26°C). There was used microculture technique for isolated taxonomic determinations and for to fixed in plate. Then there were confronted macro and microscopic characteristics in each case with different schemes that were found previously. There was determinate and characterized 23 species/categories microfungi phyllosphere, represented at 8 genera, 1 monilial morphotype and 2 zygomycetes morphotypes. *Aspergillus* and *Penicillium* genera were the least abundant. Literature reports showed to *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* as antagonist's agents of different pathogens in cultivated vegetal's species. In conclusion, the *H. brasiliensis* phyllosphere has a rich saprophytes mycobiota, which must be studied carefully in order to understand ecological relationships and to recognize it's potential like biocontrols for plant protection against pathogens of rubber.

Key words: Phyllosphere, *Hevea brasiliensis*, microfungi.

Introducción

El fomento y desarrollo del cultivo de Caucho natural *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. de Juss.) Muell. Arg en el departamento del Caquetá durante los últimos 25 años ha favorecido el establecimiento de miles de hectáreas. No obstante, las condiciones ambientales características de la zona han contribuido con el desarrollo y supervivencia de enfermedades y

plagas, que llegan a ocasionar daños severos en los tejidos de las plantas, convirtiéndose en uno de los mayores limitantes para una mayor rentabilidad de la explotación de caucho en la región (Garzón, 2000).

En esta medida, el conocimiento de la morfología y la biología de los hongos constituye un elemento fundamental para el diagnóstico de las enfermedades causadas por ellos y es base indispensable para los aspectos relacionados con

*Autor para correspondencia, E-mail: sterlingmicofungal@yahoo.es

su control y manejo (Compagnon, 1998). Este conocimiento microbiológico en el *H. brasiliensis* es clave no sólo desde el diagnóstico sintomatológico de las enfermedades sino también desde la aplicación biotecnológica con fines de biocontrol.

En la actualidad se conoce bastante sobre la biología de los organismos fitopatógenos presentes en cultivos de caucho, lo cual ha permitido diseñar estrategias de prevención y control de patógenos y de las enfermedades que ellos producen. Sin embargo, el estudio de la biodiversidad microfúngica saprofítica presente en el *H. brasiliensis* con un gran potencial para el biocontrol de enfermedades no está documentado en ningún trabajo previo, y el conocimiento del efecto antagonístico de ésta micobiota es incierto. En otro tipo de plantaciones agrícolas el potencial de diversos hongos antagonistas ha sido satisfactoriamente probado frente a múltiples patógenos (Schroth & Hancock, 1981; Cook & Baker, 1983; Fernández-Larrea, 1985).

De acuerdo con lo anterior, este estudio tuvo como objetivo determinar los microhongos presentes en la filósfera de plántulas de *H. brasiliensis* provenientes de vivero en la Amazona colombiana, con el fin de reconocer de forma preliminar la biodiversidad microfúngica filosférica y generar bases micológicas que permitan desarrollar estudios posteriores que conlleven al conocimiento de las interacciones ecológicas inherentes y su uso potencial como estrategia de fitoprotección contra los principales fitopatógenos del caucho natural.

Metodología

Área de estudio

Los viveros de caucho natural de la Asociación de Reforestadores y Cultivadores de Caucho del Caquetá - Asoheca, se encuentran ubicados en la reserva forestal de Itarca, perteneciente a la vereda Itarca del municipio de La Montañita, Departamento del Caquetá (Colombia). La zona de estudio presenta una precipitación de 3.340.1 mm, con una temperatura de 25.2°C, humedad relativa de 85.7%, brillo solar de 1.452.3 y una evaporación de 1.205.5 mm. Perteneciente al área de transición entre la cordillera oriental y la planicie amazónica: alcanza una altura máxima de 450 msnm. La extensión aproximada de la reserva es de 143.2 ha, distribuida en dos lotes de 109.5 ha y 33.7 ha. (Molina & López, 1998). Sus coordenadas son entre 1°32'54" y 1°32'50" de latitud norte y 75°28'47" y 75°28'44" de longitud oeste (Losada &

Olmedo, 2003) (Figura 1).



Figura 1. Localización del área de estudio, Viveros - ASOHECA en la Reserva Forestal de Itarca, municipio de La Montañita, Caquetá. Fuente: ASOHECA (2006).

Materiales y Métodos

Para la obtención de los microhongos desde la filósfera se colectaron muestras de hojas sanas con folíolos en estadio C1 según Halle et al. (1978). A partir de plántulas de *H. brasiliensis* obtenidas de semilla sexual. Para ello se sembraron 30 semillas de caucho individualmente, con el fin de obtener plántulas libres de contaminantes químicos, foliares y edáficos, y evitar de ésta manera afectar en el menor grado posible la dinámica microbiana existente bajo condiciones naturales de experimentación. Para evitar el deterioro por el calor y sequedad, las muestras fueron conservadas en bolsas plásticas y almacenadas en un refrigerador (Castaño & Mendoza, 1997).

Para realizar el proceso de aislamiento de los microhongos filosféricos se siguió el método de dilución en placa de Dhingra & Sinclair (1985). De esta manera, 10 gramos de hojas sanas se mezclaron con 90 ml de agua destilada estéril. A continuación se extrajo 1 ml de la suspensión y se depositó en un tubo que contenía 9 ml de agua destilada estéril. A partir de este tubo se hicieron diluciones seriadas hasta 10⁻⁷, de las cuales se eligió únicamente las diluciones del orden 10⁻³,

10-5 y 10-7. Luego, 1 ml de cada dilución se sembró individualmente y por duplicado en agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de malta (AEM), con adición de dicloxacilina 50 µg.mL⁻¹. Los cultivos se incubaron a 26 +/- 2°C entre 5 y 28 días y las colonias que se desarrollaron se repicaron en tubos de ensayo con medio inclinado de PDA y AEM cultivándose bajo las mismas condiciones.

Posteriormente, se realizó un conteo y caracterización morfológica (descripción macroscópica) de los U.F.C (unidad formadora de colonia) atendiendo a las formas tipológicas propuestas por Koneman & Roberts (1987), y la carta de colores Javascript para la cromografía. El cálculo del número de los U.F.C por cada gramo de hoja se determinó con la fórmula: U.F.C. /g hoja = U.F.C. X 1/Factor de dilución X 1/Volumen de inóculo (Valencia, 2004).

Para la identificación de las cepas se empleó la técnica de microcultivo seguida por Koneman & Roberts (1987), confrontándose en cada caso las características macro-microscópicas y culturales con los esquemas propuestos en distintas monografías. La taxonomía hasta género siguió a Samson, et al. (1984), Barnett & Hunter (1972), Von-Arx (1974), Domsch, et al. (1980) y Sutton (1980).

Resultados y Discusión

Caracterización y determinación taxonómica de los microhongos aislados

Los 7 aislamientos en PDA y 16 aislamientos en AEM de microhongos identificados en el estudio correspondieron a la División Deuteromycota: moniliales (hyphomycetes) y un morfotipo, y los melanconiales (coelomycetes) y la División Zygomycota: Clase Zygomycetes con dos morfotipos y el Orden Mucorales.

Dentro de los deuteromycota se encontró mayor variedad micobiótica: nueve especies del género *Aspergillus*, *Paecilomyces* sp., *Scopulariopsis* sp., dos especies del género *Geotrichum*, *Curvularia* sp., cuatro especies del género *Penicillium*, *Pestalotia* sp. y un Morfotipo. En la División Zygomycota se encontró: dos Morfotipos y *Cunninghamella* sp.

Aspergillus sp3., *Aspergillus fumigatus* 2 cf. y *Penicillium* sp3. fueron las especies más abundantes con 66.827%, 10.024% y 4.86% de abundancia relativa respectivamente, mientras que *Penicillium* sp4., *Pestalotia* sp. y *Cunninghamella* sp. fueron las menos abundantes, cada uno de ellas con una abundancia relativa de 0.0001%. Las demás

especies oscilaron entre 0.00039% y 3.949% de abundancia relativa.

Según Koneman & Roberts (1987), una evaluación de la tasa de crecimiento puede ser la observación más importante cuando se estudia un hongo. En general, la tasa de crecimiento de patógenos estrictos, es lenta (son necesarias de 1 a 4 semanas para ver las colonias), en contraste con los saprofitos que forman colonias en 1-5 días. En este estudio se observó que las especies del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* y *Paecilomyces* que actúan como saprofitos comunes en granos, hojas, suelo y desperdicios (Pardo-Cardona, 1995), fueron hongos de crecimiento rápido; mientras que *Cunninghamella*, reportada como una especie con igual propensión a un crecimiento rápido y profuso sobre la superficie del medio de cultivo presentó un crecimiento lento. Para el caso de *Pestalotia* sp. que es un hongo fitoparásito, con crecimiento colonial regular (Pardo-Cardona, 1995), también se evidenció un desarrollo similar a los obtenidos para los hongos del género *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Penicillium*. Esto demuestra que *Pestalotia* sp. comparte ciertas características de desarrollo en medio de cultivo con las especies de los géneros mencionados anteriormente.

Lo anterior, permite apreciar no sólo la heterogeneidad de especies, sino también la diferencia de abundancia relativa que éstos microhongos exhiben en condiciones in vitro, un criterio que está asociado con la notable inhibición bioquímica que muchas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* generan ante la presencia de otras especies, posibilitando así la aparición o no de diversos aislamientos bajo condiciones experimentales (Sterling & Jara, 2005). Además, es evidente la gran sinergia microbiana que existe en las hojas de *H. brasiliensis*; lo cual no sólo podría reflejar que es un ecosistema con condiciones apropiadas para el mantenimiento de la micobiota natural, sino que es un hábitat favorable para los hongos con potencial biocontrolador, que pueden ser empleados para el control de insectos y de enfermedades presentes en los cultivos de caucho natural en la Amazonia colombiana.

En la Figura 2 se puede apreciar algunos de los aislamientos microfúngicos obtenidos de los folíolos de *H. brasiliensis*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto: "Proyecto de investigación en la cadena productiva del caucho

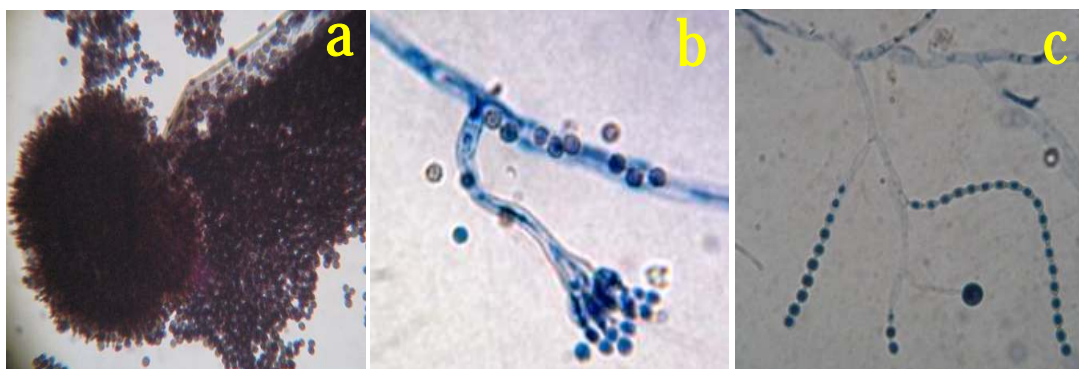


Figura 2. Estructuras microscópicas de algunos microhongos aislados de los folíolos de *H. brasiliensis*. (a) *Aspergillus* sp. Cabeza conidial radiada marrón y conidióforo sencillo hialino, objetivo 100X. (b) *Penicillium* sp2. Penicilo en primera etapa de ramificación, objetivo 40X. (c) *Paecilomyces* sp. Disposición de fíalides ahusadas, con cadenas de conidias, objetivo 40X.

natural entre la Universidad de la Amazonia y la Asociación de Reforestadores y Cultivadores de caucho del Caquetá (Asoheca)” por el soporte económico a la presente investigación; al Dr. Pablo Pineda y al Ing. Ismael Dussan de Asoheca por el apoyo logístico e institucional recibido; y a los auxiliares del laboratorio de Microbiología Uniamazonia por su colaboración en la fase práctica.

Literatura citada

- Asociación de Reforestadores y Cultivadores de caucho del Caquetá ASOHECA, 2006. Ubicación vivero y jardín clonal Itarca, municipio de La Montañita, departamento del Caquetá (Colombia).
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burges Publishing Company. United States.
- Castaño, Z. J. & Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Primera Edición. Derechos reservados, Centro editorial Universidad de Caldas. Zamorano Academia Press. Honduras C.A.
- Compagnon, P. 1998. El Caucho Natural. Biología - Cultivo - Producción. CIRAD - C.P. México. 840 p.
- Cook, J. R. & Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press. 539 p.
- Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. 4° edc. Library of Congress Cataloging in Publication Data. CRC Press. Florida. 355p.
- Domsch, K., Gams, W. & Anderson, T. 1980. Compendium of Soil Fungi. Volumen 1. Academia Press. London. 859 p.
- Fernández-Larrea O. 1985. Microorganismos entomopatógenos y antagonistas. Posibilidades de producción. CID-INISAV. Boletín Técnico, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Habana, Cuba.
- Garzón, C. F. 2000. Principales enfermedades y plagas en el cultivo de caucho (*Hevea brasiliensis*) con énfasis en la Amazonia Colombiana. Instituto Amazónico de Investigaciones científicas, SINCHI. Colombia.
- Hallé, F.; Oldeman, R. A. A. & Tomlinson OMLINSON, P.B. Tropical trees and forest. Berlin, Springer-verlag. 1978. 441 p.
- Koneman, E. & Roberts, G. 1987. Micología Práctica de Laboratorio. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 209-213 p.
- Losada, F. S. & Olmedo H. A. 2003. Análisis estructural de la composición florística de las especies arbóreas en la Reserva Forestal de Itarka del municipio de la Montañita, Caquetá. Trabajo de Grado Uniamazonia, Ingeniería Agroecológica.
- Molina, S. L. & López, V. O. 1998. Desarrollo agroforestal en el piedemonte Caqueteño. MINAMBIENTE, OIMT-CEURES.
- Pardo-Cardona, V. M. 1995. Hongos fitopatógenos de Colombia. Departamento de Biología, UNC Sede-Medellín, Centro de publicaciones. Medellín. 166p.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. & Van, C. A. 1984. Introduction to food-borne fungi. 2° edition. Institute of the Royal Netherlands, Academic of the Arts and Sciences. London, 248 p.
- Schroth, M. N. & Hancock, J.G. 1981. Selected topics in biological control. Anu. Rev. Microbiol. 35:453-76.
- Sterling, A. & Jara, L. 2005. Caracterización cualitativa del potencial enzimático de microhongos descomponedores aislados de distintos estados de hojarasca degradada de *Theobroma grandiflorum* (Willd.ex Sprengel) Schumann en la parcela Villa Erika, Municipio de Florencia (Caquetá-Colombia). Tesis de pregrado. Universidad de la Amazonia, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología con énfasis en biorrecursos. Florencia, Caquetá. 151 p.
- Sutton, C. B. 1980. The coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonealth, Surrey, England. 696p.
- Valencia, H. 2004. Manual de prácticas de microbiología básica. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 139p.
- Von Arx, J. 1974. The genera of fungi sporulating in pure